

## Polymerase Chain Reaction 法によるヒトサイトメガロ ウイルス DNA 検出法の開発

母 坪 智 行

札幌医科大学小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

吉 田 幸 一

札幌医科大学付属癌研究所分子生物学部門 (主任 藤 永 蕙 教授)

### Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Polymerase Chain Reaction Method

Tomoyuki HOTSUBO

*Department of Pediatrics, Sapporo Medical College*  
(Chief : Prof. S. CHIBA)

Koichi YOSHIDA

*Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College*  
(Chief : Prof. K. FUJINAGA)

**ABSTRACT** Polymerase chain reaction (PCR), a specific enzymatic amplification method of DNA *in vitro*, was used to detect human cytomegalovirus (HCMV) DNA. A pair of synthetic oligonucleotide primers was designed to amplify the fragment of 305 base pairs (bp) from Hind III-V fragment of HCMV AD169 strain DNA. Amplified products were detected by gel electrophoresis and by dot blot hybridization with a  $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotide probe. The primers were specific for HCMV strain and did not amplify other herpes family viruses nor human genomic DNA. Reconstitution experiments demonstrated that  $10^{-5}$  pg of the cloned amplified HCMV DNA fragment and  $10 \mu\text{l}$  aliquot of  $10^{-6}$  dilution of HCMV AD169 strain, with an infectivity titer of  $5 \times 10^{6.7}$  TCID $_{50}/\text{ml}$  were detectable by PCR method. Twenty four urine samples from asymptomatic infants were assayed by PCR. Fifteen of 18 samples from seropositive infants and one of 6 samples from seronegative infants were positive by PCR. On the other hand, 9 of 18 seropositive samples and one of 6 seronegative samples were positive by tissue culture method. All of the samples positive in tissue culture were also positive by PCR method. The results indicated that PCR assay is a rapid and sensitive method for diagnosis of HCMV infection. (Received December 21, 1989 and accepted January 12, 1990)

**Key Word ;** Human cytomegalovirus (HCMV), Polymerase chain reaction (PCR),  
Gel electrophoresis, Dot blot hybridization

### 1 緒 言

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は本邦健康成人の大部分に感染しているが、そのほとんどは不顕性に経過し、発病することは稀である<sup>1)</sup>。小児科領域においても経産道感染、経母乳感染などによる新生児期、

乳児期の母子感染は頻度は高いが、顕性発症はごく一部である。しかし胎内感染により肝脾腫、血小板減少、小頭症などを呈する古典的 cytomegalic inclusion disease、臓器移植後患者、免疫不全患者などにおける日和見感染症などでは重篤な病態を呈する。また学童期における情緒不安定、低 IQ、難聴などの神経学的異常

が、不顕性の先天性あるいは新生児 HCMV 感染症の後期症状として重要視されてきている<sup>2)</sup>。これまでの HCMV 感染症の診断は各種の血清学的診断法や細胞培養法によるウイルスの分離などによっていたが、母体由来抗体などの因子の影響、培養技術の困難性、ウイルス分離までに1~4週間を要することなど必ずしも満足の行くものとは言えなかった。しかし最近、DNA、RNA プローブを利用したハイブリダイゼーション法が診断に有用であると報告され始めている<sup>3-10)</sup>。Polymerase Chain Reaction 法 (PCR 法)<sup>17,18)</sup> は DNA 鎖の熱変性 (denaturation)、プライマーとのアニーリング (annealing)、DNA ポリメラーゼによる伸長反応 (extension) を繰り返し行うことにより *in vitro* で目的の塩基配列を増幅する方法である。我々はこの PCR 法を利用した DNA 増幅法と DNA ハイブリダイゼーション法を用いた HCMV ゲノムの検出法を開発し、臨床への応用を検討した。

## 2 材料と方法

### 2.1 細胞培養法による HCMV の分離

10%ウシ胎児血清加 Eagle's minimal essential medium (MEM) で単層培養したヒト胎児肺繊維芽細胞 (HEL 細胞) に、検体 0.2 ml を接種し、37℃で1時間吸着させた後、細胞を MEM で洗浄した。次に 2 ml の MEM を加えて 37℃で培養し、最低4週間 HCMV 特異的な細胞変性効果 (CPE) を観察した。この間、7日間隔で培養液を新鮮なものとの交換した。

### 2.2 DNA 抽出<sup>19)</sup>

#### 2.2.1 細胞 DNA の抽出

HCMV 感染、非感染 HEL 細胞を phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0 で洗浄後、0.6% SDS, 0.01 M EDTA に懸濁し、室温で20分間放置した。次に Proteinase K (最終濃度 50 µg/ml) を加えて 37℃で一夜反応させ、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出をそれぞれ2回ずつ施行した後、エタノール沈澱で回収し、沈澱を 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA (TE) に溶解した。これに RNase A (最終濃度 50 µg/ml) を加えて 37℃で30分間放置した後、SDS, Proteinase K (最終濃度それぞれ 0.5%, 50 µg/ml) を加えて2時間反応させた。フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出、エタノール沈澱にて回収した DNA を水に溶解し、波長 260 nm で吸光度を測定し、DNA 量を決定した。

#### 2.2.2 尿検体 DNA の抽出

尿検体 15 ml のうち 0.2 ml をウイルス分離に利用し、残りを 25,000 rpm・90 分間遠心し、沈澱を 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA (STE) に溶解して、SDS, Proteinase K (最終濃度それぞれ 0.5%, 50 µg/ml) を加え、細胞 DNA 抽出の場合と同様の方法で DNA を回収した。

### 2.3 PCR 法のプライマーとプローブの作製

Milligen 7500 DNA synthesizer を使用して Fig. 1 に示した 20 mer の oligonucleotide, Primer-1, Primer-2, 及び Probe-1 を作成し、HPLC で精製した。作製した oligonucleotide は <sup>32</sup>P で 5' 末端ラベル後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を施行して、そのサイズを確認した。

### 2.4 PCR

PCR は Saiki ら<sup>17,21)</sup> の方法に準じて、Gene-Amp Kit (Perkin-Elmer Cetus) を用いて行った。1 µg の DNA を 94℃・10 分間 denaturation した後、1×PCR バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Gelatin, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、各 0.2 mM の dNTP、各 0.2 µM の Primer-1, Primer-2, 2.5 units の Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus) を加えて計 100 µl とし、94℃・1 分 (denaturation)、55℃・2 分 (annealing)、72℃・2 分 (extension) を1 サイクルとして、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) にて 30 サイクル増幅した。

### 2.5 PCR 法により増幅した DNA 断片の分析

#### 2.5.1 電気泳動法

増幅後のサンプル 10~20 µl を 3% NuSieve, 1% Seakem agarose (FMC 社製) ゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して、UV ランプ下で DNA のサイズを確認した。

#### 2.5.2 ドットブロットハイブリダイゼーション法

増幅後のサンプル 1~2 µl を 94℃で10分間 denaturation を施行し、直接ナイロンメンブレン (NYTRAN, Schleicher & Schuell 社製) にブロットし、短波長の UV を10分間照射して DNA をメンブレンに固定した。次にメンブレンをプレハイブリダイゼーション溶液 (6×SSC, 10×Denhardt's, 0.5% SDS, 100 µg/ml Herring sperm DNA) で 50℃・2時間プレハイブリダイゼーションし、<sup>32</sup>P で 5' 末端ラベルした Probe-1 を加え、50℃で1時間ハイブリダイゼーションを施行した。ハイブリダイゼーション後メンブレンを 2×SSC と 0.2% SDS を含む溶液で室温で15分間、0.2×SSC と 0.2% SDS の溶液で 55℃で15分間、それぞれ2回ずつ洗浄後乾燥させ、2枚の intensifying

screen (Fuji GRENEX G-4) を使用して Fuji RX X 線フィルムにて  $-70^{\circ}\text{C}$  で 1~12 時間オートラジオグラフィを施行した。なお、プローブの 5' 末端ラベルは MEGALABEL Kit (TaKaRa 社製) を使用して以下の方法で行った。約 50 ng の Probe-1 に  $10\times$  バッファー  $1\mu\text{l}$ ,  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP  $5\mu\text{l}$ , T4 polynucleotide kinase  $1\mu\text{l}$  を加えて計  $10\mu\text{l}$  とし、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間、 $65^{\circ}\text{C}$  で 5 分間反応させた。

## 2.6 増幅 DNA 断片のクローニング

PCR 増幅後の反応液をフェノール・クロロホルム、クロロホルム・イソアミルアルコール処理し、エタノール沈澱で増幅 DNA 断片を精製し、水  $8\mu\text{l}$ ,  $10\times$  バッファー  $1\mu\text{l}$ , T4 DNA polymerase (DNA Blunting Kit, TaKaRa 社製) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させ、末端を平滑化し、DNA dilution buffer  $10\mu\text{l}$  を加えて酵素を失活させた。一方 pUC18  $1\mu\text{g}$  を Hinc II で完全に分解した後、フェノール・クロロホルム、クロロホルム・イソアミルアルコール処理し、エタノール沈澱で回収し、TE  $10\mu\text{l}$  に溶解した。調整した pUC18  $1\mu\text{l}$  (約 100 ng) と PCR 増幅 DNA 断片 (約 200~300 ng) を混和し、Solution A  $40\mu\text{l}$ , Solution B  $10\mu\text{l}$  (DNA Blunting Kit, TaKaRa 社製) を添加して  $16^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させてライゲーションを行った。反応液を *E. coli* JM109 コンピテントセルに加え、氷中で 30 分間放置後、 $42^{\circ}\text{C}$  で 90 秒間の熱処理を行いトランスフォーメーションを行った。LB 培地  $400\mu\text{l}$  を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベートした後、アンピシリン (最終濃度  $40\mu\text{g}/\text{ml}$ )、2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  $50\mu\text{l}/\text{plate}$ , 2% Iso-propyl- $\beta$ -D-thiogalactoside  $20\mu\text{l}/\text{plate}$  を加えた LB agar プレートに接種して 1 夜培養し白色コロニーを得、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリン加 LB 培地  $2\text{ml}$  に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 8 時間培養した。インサートの確認のため培養液  $1.5\text{ml}$  を  $15,000\text{rpm}\cdot 2$  分間遠心して菌体を回収し、Solution I (25mM Tris-HCl pH 8.0, 4 mg/ml Lysozyme, 10 mM EDTA, 50mM glucose)  $100\mu\text{l}$  を加え、攪拌後室温で 5 分間放置し、Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)  $200\mu\text{l}$  を加え穏やかに混和し、氷中に 5 分間放置、次に Solution III (5M  $\text{CH}_3\text{COOK}$  pH 4.8)  $150\mu\text{l}$  を加え激しく混和し、氷中に 5 分間放置後、 $15,000\text{rpm}\cdot 5$  分間遠心し、上清にエタノールを加え、DNA を沈澱させ、Pst I, Sst I で切断後 4% アガロースゲル電気泳動を行い、DNA バンドのサイズを確認した。インサートが確認されたコロニーの培養液  $0.5\text{ml}$  を  $15\text{ml}$  の LB 培地に接種し、

$37^{\circ}\text{C}$  で 6 時間培養後、 $40\text{mg}/\text{ml}$  アンピシリン加 Superbroth<sup>22)</sup> に加え一夜培養した。 $6000\text{rpm}\cdot 10$  分間遠心して菌体を回収し、上記と同様に Solution I, II, III で処理後 イソプロパノールで DNA を回収し、TE  $13.4\text{ml}$  に溶解し、 $\text{CsCl}_2$   $13.9\text{g}$ ,  $10\text{mg}/\text{ml}$  エチジウムブロマ이드  $1\text{ml}$  を加え  $15,000\text{rpm}\cdot 10$  分間遠心後上清を  $45,000\text{rpm}\cdot 16$  時間遠心してプラスミド DNA のバンドを回収し、イソアミルアルコールでエチジウムブロマイドを除去し、TE に対して 24 時間透析した。これを再度繰り返して、プラスミド DNA を精製した。

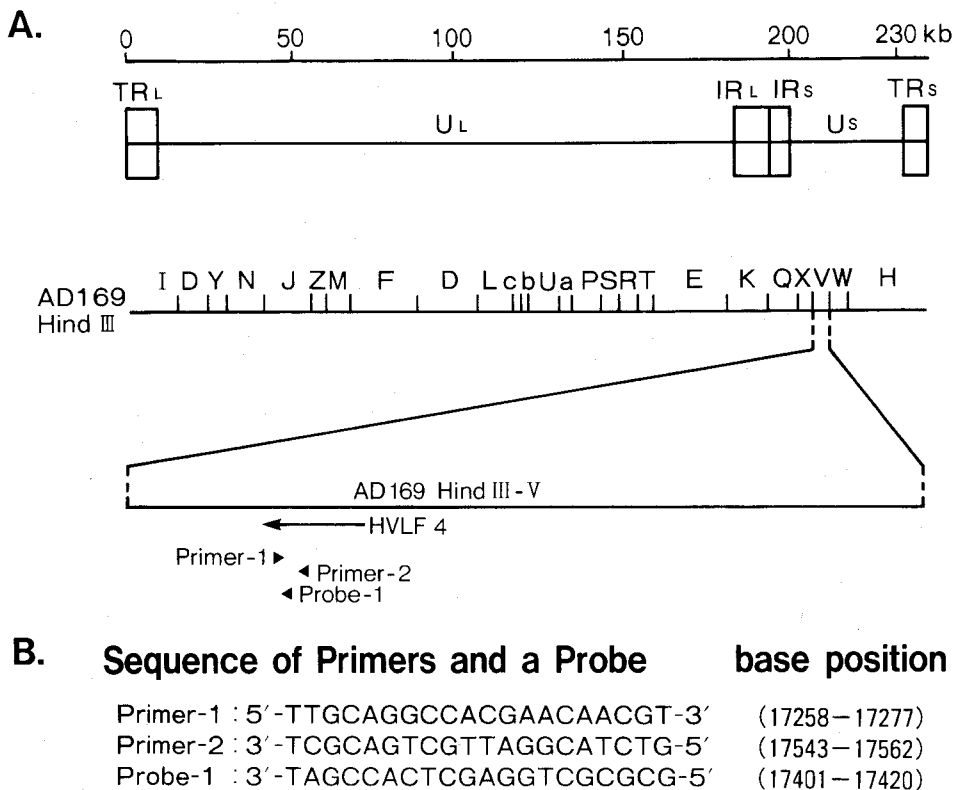
## 2.7 血清抗 HCMV 抗体の測定

尿を採取した乳児の血清抗 HCMV-IgG 抗体を EIA 法で測定した (ABBOTT CMV TOTAL AB EIA, DAINABOT 社製使用)。 $10\mu\text{l}$  の血清を  $200\mu\text{l}$  の希釈液で希釈し、表面に HCMV 抗原が固定されたビーズを加え、 $40^{\circ}\text{C}$  で 60 分間反応させ、洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を加え、 $40^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させた。次いで洗浄後、酵素基質を加え発色させ、比色計 (Quantum II, DAINABOT 社製) で波長  $492\text{nm}$  の吸光度を測定した。標準陽性及び陰性血清をコントロールとして用い、結果の判定は 3 つの陰性コントロールの平均値に  $0.075$  を加えた値をカットオフ値とし、カットオフ値以上の吸光度を示す検体を陽性、それ未満を陰性とした。

## 3 成 績

### 3.1 HCMV DNA に対するプライマー及びプローブの特異性の検討

増幅部位を設定するに当たり、これまでの報告<sup>20,23-28)</sup> から HCMV 株間で保存され、他のヒトヘルペスウイルス DNA、ヒト細胞 DNA とホモロジーを持たない部位として、HCMV AD169 株 DNA short unique region の Hind III-V 断片上の open reading frame, HVLF4 を選定した。目的断片の大きさは Taq polymerase の増幅効率、ヌクレオチド合成の正確性 (30 サイクルで約 400 塩基につき 1 塩基の割合で合成ミスが生じる)<sup>21)</sup> を考慮し、305bp とした。作製したプライマー及びプローブの HCMV DNA に対する特異性を他のヒトヘルペスウイルス DNA、HEL 細胞 DNA を用いて検討した。HCMV AD169 株、Davis 株、単純ヘルペスウイルス (HSV)-1 F 株・HSV-2 G 株 (北海道大学・歯・口腔細菌・坂岡博博士より供与)、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染 Raji 細胞 (北海道大学・医・癌研ウイルス・大里外誉郎博士より供与)、水痘・



**Fig. 1** Locations of PCR primers and a probe on the genome of HCMV AD 169 strain.

(A) Diagrams of HCMV AD169 full-length DNA, Hind III fragments, and a HVL F4 open reading frame (ORF) are based on the sequences determined by Weston and Barrell<sup>20</sup>. Arrows indicate the 5'→3' orientation of the ORF, primers, and a probe.

(B) The sequences of Primer-1, 2, and Probe-1 are shown.

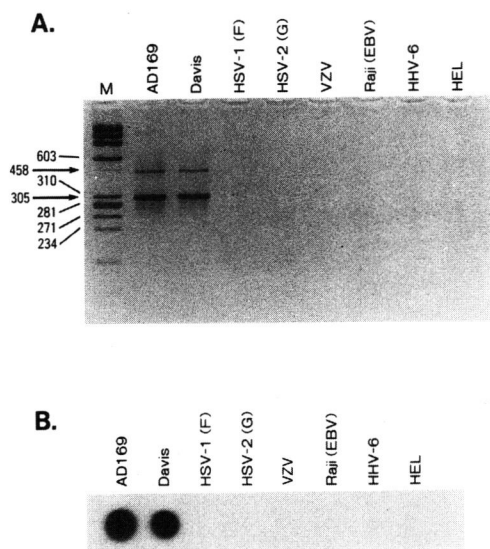
帯状疱疹ウイルス (VZV) Oka 株, Human herpes virus-6 (HHV-6) Hashimoto 株 (大阪大学・医・微研・山西弘一博士より供与) の DNA 各 1 $\mu$ g, HEL 細胞 DNA 1 $\mu$ g を鋳型として PCR を 30 サイクル施行した。電気泳動法において目的とする 305bp のバンドは HCMV AD169 株, Davis 株のみにみられた (Figure 2A)。またドットプロットハイブリダイゼーション法ではこの 2 検体のみに陽性スポットがみられた (Figure 2B)。この結果は HCMV DNA が Primer-1, 2 を用いて特異的に増幅され, Probe-1 と特異的にハイブリダイズすることを示している。尚, 電気泳動法の結果, 目的とする 305bp のバンドの他に 458 bp のバンドも出現しているが (Figure 2A), これは Primer-1 の 153base 上流に 16/20 (80%) のホモロジーを持つ塩基配列 (base position 17105-17124)<sup>20</sup> が存在するため, この部位に Primer-1 が結合して 458 bp の DNA 断片が増幅され,

検出されたものと考えられる。458 bp の増幅断片は Probe-1 をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーション法<sup>29</sup> でハイブリダイズし, また PCR の annealing 温度を 55°C から 65°C にすると 305bp の DNA 断片に比して増幅量が明らかに減少した。

### 3.2 検出感度の検討(1)

305bp の増幅 HCMV DNA 断片を組み込んだプラスミド pAD-305 を用いて希釈検出感度を検討した。HCMV 断片 1 ng 相当の pAD-305 を 1 $\mu$ g の HEL DNA に加え, これを 10 倍段階希釈して, 各希釈液を 30 サイクル増幅した。その結果, 電気泳動法では 10<sup>-3</sup> pg, ドットプロットハイブリダイゼーション法では 10<sup>-5</sup> pg までの検出が可能であった。 (Figure 3A, B)。これは PCR 法によって, 10<sup>-1</sup>~10<sup>-3</sup> pg の HCMV DNA を検出可能であることを示している。

### 3.3 検出感度の検討(2)

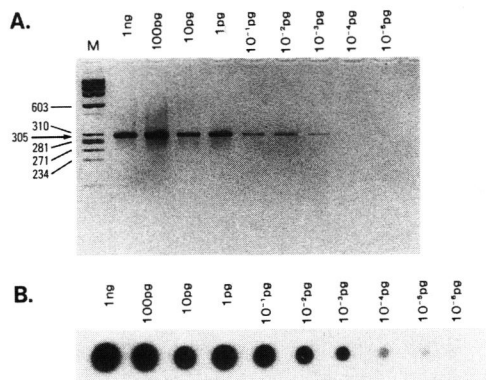


**Fig. 2** The specificity of the PCR method.

To estimate the specificity of the PCR method, 1  $\mu$ g DNA of HCMV AD169 strain, HCMV Davis strain, Herpes simplex virus (HSV)-1 F strain, HSV-2 G strain, Varicella-zoster virus (VZV) Oka strain, Raji cells infected with Epstein-Barr virus (EBV), Human herpes virus-6 (HHV-6) Hashimoto strain, and HEL cells without infection were amplified 30 cycles by PCR using Primer-1 and 2. Amplified products were detected by 4% agarose gel electrophoresis (A) and by dot blot hybridization with  $^{32}$ P-labeled Probe-1 (B). Arrows indicate positions of amplified products of 305 bp and 458 bp.

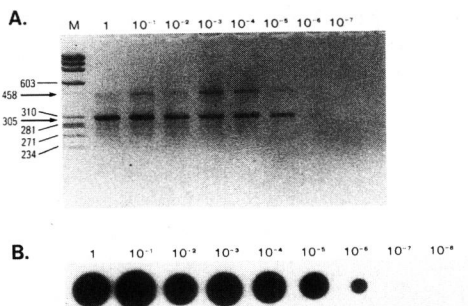
M : Size marker, Hae III fragments of  $\phi$ x 174 DNA

PCR法によるHCMV検出感度を細胞培養法による検出感度と比較するため、HCMV AD169株ウイルス液を10倍段階希釈して、各希釈液につきPCR法と細胞培養法を施行した。細胞培養法はHEL細胞を単層培養した4本のチューブに各希釈液を0.2 mlずつ接種し、4週間培養してHCMV特異的CPEを観察した。その結果、実験に用いたウイルス液の感染価は $5 \times 10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった<sup>30)</sup>。PCR法は各希釈液10  $\mu$ lを94°C・10分間denaturationさせ、ただちに30サイクル増幅した。その結果、電気泳動法では $10^{-5}$ 希釈、ドットプロットブリダイゼーション法では $10^{-6}$ 希釈まで(感染価としてそれぞれ、 $5 \times 10^{-0.3}$  TCID<sub>50</sub>、 $5 \times 10^{-1.3}$  TCID<sub>50</sub>まで)検出可能であった(Figure 4A, B)。



**Fig. 3** The sensitivity of the PCR method.

To estimate the sensitivity of the PCR method, constructed pAD-305 plasmid with 305 bp HCMV DNA fragment (1 ng as HCMV DNA) was mixed with 1  $\mu$ g of HEL cell DNA and diluted serially with HEL cell DNA. Each diluted solution was amplified 30 cycles and the amplified products were detected by 4% agarose gel electrophoresis (A) and by dot blot hybridization (B). The arrow indicates the amplified 305 bp DNA. M : Size marker, Hae III fragments of  $\phi$ x 174 DNA



**Fig. 4** The sensitivity of the PCR method relative to tissue culture.

To estimate the sensitivity of the PCR method relative to tissue culture, HCMV AD169 strain solution, with an infectivity titer of  $5 \times 10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml, was diluted serially with PBS.

Each diluted 10  $\mu$ l solution was heat-denatured for 10 minutes, directly subjected to 30 cycles of amplification, and detected by 4% agarose gel electrophoresis (A) and by dot blot hybridization (B). Arrows indicate amplified 305 bp and 458 bp products.

M : Size marker, Hae III fragments of  $\phi$ x 174 DNA

Table 1 Comparison of HCMV detection from urine samples by PCR and by tissue culture.

HCMV-IgG Ab (EIA)	tissue culture		PCR	
	positive	negative	positive	negative
positive (n=18)	9	9	15	3*
negative (n= 6)	1	5	1	5*

\*All samples which are negative by PCR are also negative by tissue culture.

すなわち、PCR 法は細胞培養法と比べて、少なくとも 10 倍程度の HCMV DNA 検出感度を持つことになる。

### 3・4 尿検体への応用

北海道立中央乳児院に在籍する健康乳児 24 名において、血清抗 HCMV 抗体の有無、尿からのウイルス分離、尿中 HCMV ゲノムの PCR 法による検出について比較検討した (Table 1)。乳児の年齢構成は 1 カ月から 8 カ月 (平均 5.1 カ月) で基礎疾患を持つもの、明らかに感染症に罹患している者は除外した。EIA 法による血清抗 HCMV 抗体の検索では、陽性 18 名、陰性 6 名で、抗体保有率は 75% であった。抗体陽性 18 名中、細胞培養法陽性 9 名、陰性 9 名、PCR 法陽性 15 名、陰性 3 名であった。一方、抗体陰性 6 名中、細胞培養法陽性 1 名、陰性 5 名、PCR 法陽性 1 名、陰性 5 名であり、細胞培養法と PCR 法の陽性検体は同一であった。抗体の有無に関わらず細胞培養法陽性であった検体は全て PCR 法陽性であった。また細胞培養法で陰性であっても PCR 法で陽性であった検体が 6 検体あった。

## 4 考 察

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法は *in vitro* で特定の塩基配列を酵素反応により増幅させる方法で、数時間の内に容易に 100 万倍以上の増幅断片を得ることが可能である。PCR 法は 1985 年に Saiki ら<sup>17)</sup> が sickle cell anemia の診断のために genomic DNA 中の  $\beta$ -globin の sequence を増幅した報告が初めてである。この原法では酵素として *E. coli* DNA ポリメラーゼ I の Klenow fragment を使用していた。しかし、Klenow fragment は熱に弱いので、合成鎖を切り離すための heat denaturation step で失活してしまい、次のサイクルに移る際、酵素を補充する必要があった。また Klenow fragment を使用した PCR 法では annealing, extension の温度が 30℃ 程度になるため、非特異的な塩基の結合が多く、様々な産物が合成され、目的断片はその中のほんの一部ということが多かった。したがって、電気泳動法のみでの結果判定は困難であり、

クローニングその他への応用にも不都合であった。しかし、Chien ら<sup>31)</sup> が Thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* から精製した耐熱性 DNA ポリメラーゼ (Taq polymerase) を 1988 年に Saiki ら<sup>21)</sup> が PCR 法に初めて利用し、これらの問題は解決された。すなわち、Taq polymerase は denaturation の温度でも失活しないため、各サイクル毎の追加が不要となった。また annealing 温度、extension 温度を 50~70℃ と高くできるようになったため、非特異的な合成が大幅に減少し、目的断片のみを増幅することが可能となった。この結果、2000 bp 以上の断片の増幅も可能となり<sup>21)</sup>、クローニング、シークエンス<sup>32,33)</sup>、遺伝性疾患の診断<sup>17,34-40)</sup>、ウイルスゲノムの検出<sup>41-52)</sup>、癌遺伝子の検出<sup>53,54)</sup> などへの応用が可能となった。PCR 法はこのように特定の微量の塩基配列を短時間に、容易に増幅できる一方で、検体間、試薬、使用器具などの汚染による false-positive が出現し易いという欠点を持つ。Kwok・Higuchi<sup>55)</sup> はこの false-positive について警告し、その予防について述べている。必ず陽性及び陰性コントロールを置くことはもちろんとして、検体の調整と PCR 法とを隔離する、反応チューブのキャップの裏に付着しているかも知れない検体にまで注意して検体間の汚染を防ぐ、PCR 法専用の実験器具を使用するなど、操作段階での諸注意に加えて、結果の判定にも十分注意する必要があるとしている。我々も彼らの勧める方法に準じて実験を行った。また、PCR 法の増幅率は 25~30 サイクルまではサイクル数にほぼ相関するため<sup>21)</sup>、必要最小限のサイクル数で使用可能な系を確立することも重要であると考えられる。我々の経験では 35 サイクル以上となると false-positive の出現率が明らかに高くなるように思われた。

HCMV は出生前の経胎盤感染、出生時の経産道感染、乳児期の経母乳感染、その後の水平感染により本邦では成人に達するまでに大部分が初感染を受ける。しかし、そのうちの 99% は不顕性に経過し、HCMV は体内の多数の組織内に潜伏感染するものと考えられている。このため一般健康成人において臨床的に問題とな

ることはほとんどないが、胎児・新生児期感染、輸血、臓器移植などにおける医原的感染、あるいは悪性腫瘍患者、AIDS患者などのcompromised hostにおける日和見感染の際に問題となり、しばしば致死経過をたどる。しかし最近ではGanciclovir (DHPG) と高力価CMV免疫グロブリンの併用が骨髄移植後のHCMV肺炎に有効であった<sup>56,57)</sup> など、治療薬の研究、開発も進んでおり、迅速で正確で高感度なHCMV感染症の診断がますます重要になってきている。HCMV感染症の診断法は大きく分けて以下の4つに分類される。

(1)ウイルス分離、(2)抗体検査<sup>58)</sup>、(3)組織学的検査、(4)抗原・ゲノム検出であるがいずれにも問題点があり、1つの検査で事足りるという訳にはいかない。HCMVの分離にはヒトの二倍体細胞、主にヒト胎児肺組織維芽細胞(HEL細胞)が用いられるが、HCMVの増殖は非常に緩徐であるため、分離までに1~4週間を要し、この間の培養には熟練した技術を要する。また、生後2週間以内に分離された場合には子宮内感染の証拠となるが、それ以外で初感染、再感染、再活性化と持続感染を鑑別することは不可能である。抗体にはCF(IgG)抗体、IF(蛍光抗体法)抗体(LA(後期抗原)抗体、EA(初期抗原)抗体、IgM抗体)、EIA・ELISA抗体(IgG、IgM)がある。CF、IF-LA、EIA-IgG抗体は初感染時(母体由来抗体の消失する生後6カ月以降)にベア血清で抗体価が有意に上昇した場合のみ意義があり、再活性化の時にはほとんど抗体価の上昇はみられない。EA抗体の存在は母体由来EA抗体が消失する生後2週目以降は乳児においても初感染の証拠になる。またEA抗体は活動性HCMV感染が終息すると陰性化し、潜伏感染時は陰性のままで、再活性化で再び出現する。IgM抗体は顕性感染の急性期に検出されるが、その出現は短期間である。組織学的には病変部位にHE染色で核内封入体陽性巨細胞を証明する、あるいはモノクローナル抗体、核酸プローブで抗原、ゲノムを検出すれば診断の決め手となるが、特に小児科領域での組織の採取は非常に困難である。抗原の検索はモノクローナル抗体を使用し、FAあるいはEIA法で行う。ゲノムの検出は<sup>32</sup>Pなどの放射性同位元素あるいはビオチンなどの色素で標識した核酸プローブをウイルスDNAにハイブリダイズさせて行う。HCMVのDNAハイブリダイゼーション法は1983年にChouら<sup>3)</sup>によって、初めて行われた。彼らは<sup>32</sup>PでラベルしたHCMV AD169株DNA EcoRI-O断片をプローブとして、尿からHCMVゲノムを検出した。その感度はDNA量として、5 pg (HCMV DNAとして $10^4$ 分子)、感染価としては

$10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml以上のウイルスを検出可能であった。翌年Spectorら<sup>4)</sup>はHCMV AD169株DNA EcoRI-B,D断片をプローブとして骨髄移植のrecipientの尿及びbuffy-coatからHCMV DNAを検出したと報告している。彼らの方法の検出限界は10 pg程度であった。その後、非アイソトープ標識プローブの使用<sup>8,9,16)</sup>、RNAプローブの使用<sup>10)</sup>、*in situ* hybridization<sup>5,13)</sup>などによるHCMV DNAの検出について次々と報告されてきた。PCR法を初めてHCMV DNA検出に応用したのは、1988年のDemmlerら<sup>49)</sup>、Shibataら<sup>50)</sup>である。Demmlerらはimmediate-early (IE)とlate antigen (LA)領域の2組のプライマーを用いて40サイクルの増幅で臨床分離株及び尿検体を検索し、良好な結果を得ている。検出感度は $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mlのウイルス液5  $\mu$ lを用いて $10^{-4}$ 希釈までであった。Shibataらも同じくIEとLA領域の2組のプライマーを用いて30サイクル増幅して、HIV感染患者の血液からのHCMV DNAの検出に成功している。感度は1 PFU (Plaque Forming Units)のウイルスを検出できるほどであった。翌1989年にはHsiaら<sup>51)</sup>がHCMV AD169株DNA EcoRI-D断片に2組のプライマーを作製して、20~25サイクルの増幅で尿検体を検索している。感度はAD169感染細胞1個あるいはAD169 DNA EcoRI-D断片0.01 pgを検出できるものであった。今回我々が開発した方法はHCMV DNAを特異的に増幅し、その感度はプラスミドDNAで $10^{-5}$  pg (HCMV DNAとして $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$  pg)、 $5 \times 10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/mlのウイルス液10  $\mu$ lを用いて $10^{-6}$ 希釈( $5 \times 10^{-1.3}$  TCID<sub>50</sub>)まで検出可能であった。これは従来のDNAハイブリダイゼーション法の $10^4$ ~ $10^5$ 倍感度が高く、これまでに報告されたPCR法と比べても同等あるいはそれ以上の検出感度であった。また所用時間もPCRに必要な3~4時間が新たに必要となるだけで、24時間以内の結果の判定が可能であった。また感度は10倍程度落ちるが電気泳動法までで検査を終了すれば時間は大幅に短縮され迅速性はさらに増すことになる。サイクル数と増幅率はほぼ相関するが30サイクルを越えるとほぼプラトーとなり、前記のごとく35サイクル以上となると明らかにfalse-positiveが多くなり、非特異的なバンドも出現しやすくなるため、我々は増幅回数を30サイクルとした。本法の定量性については困難であるとの報告があり<sup>59)</sup>、我々の実験でもDNA量とバンドの濃さ、ドットの大きさは必ずしも相関せず、定量化は難しいと思われた。この原因としては抽出したDNAの純度の問題(Taq polymeraseの阻害物質の混入を含めて)、抽出の際の

回収率の問題などが考えられる。健康乳児尿を用いての検索において、EIA 抗体陰性、細胞培養法、PCR 法共に陽性という児が1名いた。この1名は8カ月の男児であったが、1, 3カ月後のEIA 抗体が陽転しており、検査直前に初感染していたものと考えられ、この場合は水平感染であったことになる。また、EIA 抗体陽性かつPCR 法陰性という児が3名あり、このうち1名は3カ月児で他の2名は4カ月児であった。この場合考えられることとして、(1)抗体は母体由来抗体であり、児は感染していなかった。(2)児は感染し、抗体価も上昇しているが、尿中へのウイルス排出がなかった。(3)児は感染し、抗体価も上昇し、ウイルス排出もあったが、ウイルスDNAの増幅部位に欠失があった、などがある。Demmler ら<sup>49)</sup>、Shibata ら<sup>50)</sup>の報告ではIE, LA 領域のプライマーを使用した場合、一方のみで陽性となる検体が存在しており、また今回は細胞培養法陽性かつPCR 法陰性という検体はなかったが、その可能性も有り得るので、実際に診断に用いる際には複数のプライマーを組み合わせて使用することも考慮する必要があると思われる。輸血、臓器移植を介した医原的感染問題が重要視される中、HCMV の血液細胞成分中の潜伏感染部位を明らかにすることは重要な課題である。しかし、HIV 感染者や臓器移植後患者の血液からのPCR 法によるHCMV DNA 検出の報告<sup>4,50)</sup>はあるものの、我々のpreliminary なdataを含めて、これまでに健康成人からの検出報告例はなかった<sup>11,50)</sup>。しかし、1989年、Stainer ら<sup>52)</sup>がIE領域のプライマーを用いて、30サイクルの増幅で無症候性の抗体陽性者のbuffy-coat からHCMV ゲノムを検出したと報告している。感度その他の詳細は不明だが、医原的感染の予防、HCMV の潜伏感染様式に関わる問題を含めて興味深い。本法を含め、ウイルスゲノムの検出は細胞培養法に比べ迅速かつ高感度であるが、あくまでも感染の証明であり、病原性の証明とはならない。従って我々は、IE, LA 領域の発現するmRNA をPCR 法を用いて検出することにより、潜伏感染、ウイルスの再活性化の証明へと本法を拡げて行くことを現在検討中である。また、HCMV は凍結保存させた材料からの分離が一般に困難であるが、本法では凍結材料も利用でき、臨床面への幅広い応用が期待できる。

## 5 結 語

Polymerase chain reaction (PCR) 法とDNA ハイブリダイゼーション法を用いたヒトサイトメガロウイルス (HCMV) DNA 検出法の開発を試み以下の成

績を得た。

1) 作製したプライマーはHCMV DNA を特異的に増幅し、他のヒトヘルペスウイルスDNA, HEL 細胞DNAを増幅しなかった。また作製したプローブを用いて増幅HCMV DNA 断片を特異的に検出できた。

2) 増幅HCMV DNA 断片を組み込んだプラスミドを用いた再構成実験において、PCR 法の検出感度は電気泳動法で $10^{-3}$  pg, ドットプロットハイブリダイゼーション法で $10^{-5}$  pg (HCMV DNA としてそれぞれ、 $10^{-1} \sim 10^{-2}$  pg,  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  pg) であった。

3) 感染価 $5 \times 10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml のHCMV AD169 株ウイルス液を用いての検出感度は電気泳動法で $10^{-5}$  希釈 ( $5 \times 10^{-0.3}$  TCID<sub>50</sub>)、ドットプロットハイブリダイゼーション法で $10^{-6}$  希釈 ( $5 \times 10^{-1.3}$  TCID<sub>50</sub>) までであった。すなわち、PCR 法は細胞培養法の少なくとも10倍程度のHCMV DNA 検出感度を持つことになる。

4) 健康乳児尿を用いたPCR 法と細胞培養法との比較で、抗体陽性者18名中、PCR 法陽性15名、細胞培養法陽性9名であった。また、細胞培養法陽性者はPCR 法で全て陽性であった。

5) PCR 法による結果の判定までに要する時間は24時間以内で、従来のHCMV 検出法に比べ、高感度かつ迅速性に優れ、凍結材料の使用も可能であり、臨床への幅広い応用が可能であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた藤永蕙教授、千葉峻三教授に深く敬意を表します。又、貴重な尿、血清検体を提供していただいた札幌医科大学小児科加江進医師ならびにご協力いただいた札幌医科大学小児科学講座、付属癌研分子生物部門の諸先生に深く感謝致します。本論分の要旨の一部は第25回日本ウイルス学会北海道支部総会、第21回日本小児感染症学会、第37回日本ウイルス学会総会において発表した。尚、本研究の一部は文部省科学助成金一般研究B (千葉) によって行われた。

## 文 献

1. 千葉峻三: サイトメガロウイルス感染症。新小児医学体系20C 小児感染病学III, 53-66, 中山書店, 東京 (1981)。
2. Kumar, M. L., Nankervis, G. A., Jacobs, I. B., Ernhart, C. B., Glasson, C. E., McMillan, P. M. and Gold, E.: Congenital and postnatally acquired cytomegalovirus infections: Long-term follow-up. *J. Pediatr.* 104, 674-679 (1984)。



3. Chou, S. and Merigan, T. C.: Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N. Engl. J. Med.* **308**, 921-925 (1983).
4. Spector, S. A., Rua, J. A., Spector, D. H. and McMillan, R.: Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *J. Infect. Dis.* **150**, 121-126 (1984).
5. Myerson, D., Hackman, R. C. and Meyers, J. D.: Diagnosis of cytomegaloviral pneumonia by in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* **150**, 272-277 (1984).
6. Virtanen, M., Syvänen, A.-C., Oram, J., Söderlund, H. and Ranki, M.: Cytomegalovirus in urine: Detection of viral DNA by Sandwich hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 1083-1088 (1984).
7. Kahan, B. D. and Landers, T. A.: Rapid detection of cytomegalovirus infection using a DNA probe. *Transplant. Proc.* **17**, 989-992 (1985).
8. Lurain, N. S., Thompson, K. D. and Farrand, S. K.: Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by using biotinylated DNA probes and analysis of cross-reactivity with herpes simplex virus. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 724-730 (1986).
9. Buffone, G. J., Schimbor, C. M., Demmler, G. J., Wilson, D. R. and Darlington, G. J.: Detection of cytomegalovirus in urine by nonisotopic DNA hybridization. *J. Infect. Dis.* **154**, 163-166 (1986).
10. Schuster, V., Matz, B., Wiegand, H., Traub, B., Kampa, D. and Neumann-Haefelin, D.: Detection of human cytomegalovirus in urine by DNA-DNA and RNA-DNA hybridization. *J. Infect. Dis.* **154**, 309-314 (1986).
11. Jackson, J. B., Orr, H. T., McCullough, J. J. and Jordan, M. C.: Failure to detect human cytomegalovirus DNA in IgM-seropositive blood donors by spot hybridization. *J. Infect. Dis.* **156**, 1013-1016 (1987).
12. Augustin, S., Popow-Kraupp, T., Heinz, F. X. and Kunz, C.: Problems in detection of cytomegalovirus in urine samples by dot blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1973-1977 (1987).
13. Keh, W. C. and Gerber, M. A.: In situ hybridization for cytomegalovirus DNA in AIDS patients. *Am. J. Pathol.* **131**, 490-496 (1988).
14. Agha, S. A., Coleman, J. C., Selwyn, S., Mahmoud, L. A., Abd-Elal, A. M. and Archard, L. C.: Detection of human cytomegalovirus by slot-blot hybridization assay employing oligo-primed <sup>32</sup>P-labelled probe. *J. Med. Virol.* **26**, 419-427 (1988).
15. Agha, S. A., Mahmoud, L. A., Archard, L. C., Abd-Elal, A. M., Selwyn, S., Mee, A. D. and Coleman, J. C.: Early diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant and dialysis patients by DNA-DNA hybridization assay. *J. Med. Virol.* **27**, 252-257 (1989).
16. 満田年宏, 横田俊平, 鳥羽和憲: 非アイソトープ標識 DNA プローブによるヒトサイトメガロウイルス DNA の検出, *医学のあゆみ* **148**, 831-832 (1989).
17. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
18. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki R., Horn, G. and Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, part I, 263-273 (1986).
19. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
20. Weston, K. and Barrell, B. G.: Sequences of the short unique region, short repeats, and part of the long repeats of human cytomegalovirus. *J. Mol. Biol.* **192**, 177-208 (1986).
21. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
22. Yamamoto, T., Sobel, M. E., Adams, S. L., Avvedimento, V. E., DiLauro, R., Pastan, I., de Crombrughe, B., Showalter, A., Pesciotta, D., Fietzek, P. and Olsen, B.: Construction of a recombinant bacterial plasmid containing Pro- $\alpha 1$  (I) collagen DNA sequences. *J. Biol. Chem.* **255**, 2612-2615 (1980).
23. Rüger, R., Bornkamm, G. W. and Fleckenstein, B.: Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J. Gen. Virol.* **65**, 1351-1364 (1984).
24. Shaw, S. B., Rasmussen, R. D., McDonough, S. H., Staprans, S. I., Vacquier, J. P. and Spector, D. H.: Cell-related sequences in the DNA

- genome of human cytomegalovirus strain AD 169. **J. Virol.** **55**, 843-848 (1985).
25. Hennighausen, L. and Fleckenstein, B.: Nuclear factor 1 interacts with five DNA elements in the promoter region of the human cytomegalovirus major immediate early gene. **EMBO J.** **5**, 1367-1371 (1986).
  26. Tamashiro, J. C. and Spector, D. H.: Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. **J. Virol.** **59**, 591-604 (1986).
  27. Efsthathiou, S., Gompels, U. A., Craxton, M. A., Honess, R. W. and Ward, K.: DNA homology between a novel human herpesvirus (HHV-6) and human cytomegalovirus. **Lancet** **1**, 63-64 (1988).
  28. Cranage, M. P., Smith, G. L., Bell, S. E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A. T., Tomlinson, P., Barrell, B. G. and Minson, T. C.: Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. **J. Virol.** **62**, 1416-1422 (1988).
  29. Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**, 503-517 (1975).
  30. 大谷明, 黒川正身: ウイルス学に必要な数値の扱い方, 国立予防衛生研究所学会編: ウイルス実験学総論 479-504, 丸善, 東京 (1973).
  31. Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **J. Bacteriol.** **127**, 1550-1557 (1976).
  32. Engelke, D. R., Hoener, P. A. and Collins, F. S.: Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 544-548 (1988).
  33. Stofflet, E. S., Koeberl, D. D., Sarkar, G. and Sommer, S. S.: Genomic amplification with transcript sequencing. **Science** **239**, 491-494 (1988).
  34. Embury, S. H., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Gholson, M. A., Golbus, M., Arnheim, N. and Erlich, H. A.: Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. **N. Engl. J. Med.** **316**, 656-661 (1987).
  35. Saiki, R. K., Chang, C.-A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr. and Erlich, H. A.: Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. **N. Engl. J. Med.** **319**, 537-541 (1988).
  36. Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A. and Kazazian, H. H., Jr.: Characterization of  $\beta$ -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. **Nature** **330**, 384-386 (1987).
  37. Dilella, A. G., Huang, W.-M. and Woo, S. L. C.: Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Lancet** **1**, 497-499 (1988).
  38. Kogan, S. C., Doherty, M. and Gitschier, J.: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. **N. Engl. J. Med.** **317**, 985-990 (1987).
  39. Feldman, G. L., Williamson, R., Beaudet, A. L. and O'Brien, W. E.: Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism. **Lancet** **2**, 102 (1988).
  40. Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S. and Kahn, A.: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. **Nature** **336**, 858-860 (1988).
  41. Kwok, S., Mack, D. H., Mullis, K. B., Poiesz, B., Blair, D., Friedland-Kien, A. and Sninsky, J. J.: Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. **J. Virol.** **61**, 1690-1694 (1987).
  42. Loche, M. and Mach, B.: Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. **Lancet** **2**, 418-421 (1988).
  43. Laure, F., Courgnaud, V., Rouzioux, C., Blanche, S., Veber, F., Burgard, M., Jacomet, C., Griscelli, C. and Brechot, C.: Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet** **2**, 538-540 (1988).
  44. Duggan, D. B., Ehrlich, G. D., Davey, F. P., Kwok, S., Sninsky, J., Goldberg, J., Baltrucki, L. and Poiesz, B. J.: HTLV-I-induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease. Diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA. **Blood** **71**, 1027-1032 (1988).
  45. Kwok, S., Kellogg, D., Ehrlich, G., Poiesz, B., Bhagavati, S. and Sninsky, J. J.: Characterization of a sequence of human T cell leukemia virus type I from a patient with chronic progressive myelopathy. **J. Infect. Dis.** **158**, 1193-1197

- (1988).
46. Shibata, D. K., Arnheim, N. and Martin, W. J.: Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. **J. Exp. Med.** **167**, 225-230 (1988).
47. Sumazaki, R., Motz, M., Wolf, H., Heinig, J., Jilg, W. and Deinhardt, F.: Detection of hepatitis B virus in serum using amplification of viral DNA by means of the polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.** **27**, 304-308 (1989).
48. Gama, R. E., Horsnell, P. R., Hughes, P. J., North, C., Bruce, C. B., Al-Nakib, W. and Stanway, G.: Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.** **28**, 73-77 (1989).
49. Demmler, G. J., Buffone, G. J., Schimbor, C. M. and May, R. A.: Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. **J. Infect. Dis.** **158**, 1177-1184 (1988).
50. Shibata, D., Martin, W. J., Appleman, M. D., Causey, D. M., Leedom, J. M. and Arnheim, N.: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.** **158**, 1185-1192 (1988).
51. Hsia, K., Spector, D. H., Lawrie, J. and Spector, S. A.: Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** **27**, 1802-1809 (1989).
52. Stanier, P., Taylor, D. L., Kitchen, A. D., Wales, N., Tryhorn, Y. and Tynms, A. S.: Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. **Br. Med. J.** **299**, 897-898 (1989).
53. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. and Perucho, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell** **53**, 549-554 (1988).
54. Morgan, G. J., Hughes, T., Janssen, J. W. G., Gow, J., Guo, A.-P., Goldman, J. M., Wiedemann, L. M. and Bartram, C. R.: Polymerase chain reaction for detection of residual leukaemia. **Lancet** **1**, 928-929 (1989).
55. Kwok, S. and Higuchi, R.: Avoiding false-positives with PCR. **Nature** **339**, 237-238 (1989).
56. Emanuel, D., Cunningham, I., Jules-Elysee, K., Brochstein, J. A., Kernan, N. A., Laver, J., Stover, D., White, D. A., Fels, A., Polsky, B., Castro-Malaspina, H., Peppard, J. R., Bartus, P., Hammerling, U. and O'Reilly, R. J.: Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of Ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. **Ann. Intern. Med.** **15**, 777-782 (1988).
57. Reed, E. C., Bowden, R. A., Dandliker, P. S., Lilleby, K. E. and Meyers, J. D.: Treatment of cytomegalovirus pneumonia with Ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. **Ann. Intern. Med.** **15**, 783-788 (1988).
58. 沼崎義夫: サイトメガロウイルス感染症の臨床と診断. **小児内科** **21**, 349-353 (1989).
59. Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ  $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature** **324**, 163-166 (1986).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 母坪智行